

3  
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ  
On-line версия журнала на сайте  
<http://www.elmag.uran.ru>

# БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

*Lycaena thersamon* (Esper, 1784)  
Червонец блестящий  
Шовкун Д.Ф.



2019

УЧРЕДИТЕЛЬ  
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© И.А. Здвижкова, С.В. Андриященко, 2019

УДК 579.63

*И.А. Здвижкова, С.В. Андриященко*

## **ПЦР-МОНИТОРИНГ ПЕРСИСТЕНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ**

Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН (Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН), Оренбург, Россия

*Цель.* Оценить распространенность и сочетанность генетических детерминант персистенции условно-патогенных энтеробактерий и их отдельных фенотипических проявлений.

*Материалы и методы.* В работе использована разработанная ранее тест-система множественного ПЦР-анализа (Патент РФ №2662930). Проведен ПЦР-скрининг 160 штаммов условно-патогенных энтеробактерий, относящихся к видам *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из разных источников.

*Результаты.* У пациентов с хроническими заболеваниями (заболевания ЖКТ и реактивный артрит) встречаемость детерминант колибактина выше, чем у штаммов от условно-здоровых пациентов. Выделенные из ЖКТ условно-патогенные *E. coli* с гемолитической активностью в  $\frac{3}{4}$  случаев – носители генов колибактина. При уроинфекциях частота встречаемости генов аэробактина составляет более половины штаммов.

*Заключение.* Множественный скрининг генетических детерминант персистенции энтеробактерий с одной стороны подтверждает ранее установленную роль аэробактина для уропатогенности, с другой демонстрирует возможную адаптивную связь систем колибактина и гемолизина.

*Ключевые слова:* мультиплекс-ПЦР, энтеробактерии, персистенция микроорганизмов, патогенность.

---

---

*I.A. Zdvizhkova, S.V. Andryuschenko*

## **PCR-MONITORING OF THE PERSISTENCE POTENTIAL OF ENTEROBACTERIA**

Orenburg Federal Research Center, UB RAS (Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UB RAS), Orenburg, Russia

*Objective.* To estimate the prevalence and combination of the genetic determinants of persistence of opportunistic commensal enterobacteria and some of their phenotypic manifestations.

*Materials and methods.* Previously developed PCR-test system was used (Patent RU 2662930). A PCR-screening of 160 commensal *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different human host sources was performed.

*Results.* The prevalence of colibactin determinants in the enterobacteria strains from patients with chronic diseases (gut diseases and reactive arthritis) was higher than in the strains from healthy patients. The commensal strains isolated from human gut with hemolytic activity are colibactin genes carriers in  $\frac{3}{4}$  cases. The prevalence of aerobactin genes in the enterobacteria from urinary tract infections was more than a half of the studied strains.

*Conclusion.* Multiplex screening of the genetic determinants of persistence of enterobacteria confirms the previously determined role of aerobactin in uropathogenicity on the one hand and demonstrates putative adaptive connection between the colibactin and haemolysin systems.

*Keywords:* multiplex PCR, enterobacteria, persistence of microorganisms, pathogenicity.

## **Введение**

Существующие экспресс-системы биомониторинга ориентированы на выявление видов-индикаторов загрязнения, в то время как болезнетворный потенциал как условно-патогенных, так и патогенных микроорганизмов может существенно различаться у разных штаммов.

Одним из ключевых фенотипических маркеров персистентного профиля бактерий является антилизосимная активность, которая отражает, главным образом, способность клетки к продукции экскретируемых соединений, обеспечивающих инактивацию лизоцима в питательной среде [1].

Одним из базовых маркеров патогенности бактерий в виду широкой распространенности является гемолизин – порообразующий токсин [2].

Некоторые штаммы *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* продуцируют аэробактин – сидерофор, связывающий железо для дальнейшего переноса внутрь бактериальной клетки с целью его извлечения из биотопов, бедных железом (например, таких, как мочевыводящий тракт), что также является фактором патогенности [3].

Генотоксин-колибактин – токсин полипептидной природы, способный проникать в ядро клетки хозяина и связываться там с ДНК, нарушая нормальный процесс репликации, становясь фактором риска развития злокачественных опухолей (прежде всего – прямой кишки) [4].

Энтеротоксин типа С – самотранспортирующийся токсин острой диареи, обладающий способностью инактивировать лизоцим – важный фермент защиты хозяина [5].

Определение факторов вирулентности и персистенции микроорганизмов доступно с помощью существующих микробиологических методов, но все они обладают существенными недостатками: большие затраты труда и времени (1-3 суток), необходимого для проведения анализа выделяемых микроорганизмов, что не позволяет использовать их для задач массового микробиологического мониторинга.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет добиться практически полной специфичности – выявления уникального фрагмента ДНК, характерного только для данного возбудителя; отсутствуют ошибки в связи с перекрестно-реагирующими антигенами, выявляемыми методами иммунологической диагностики. Экстремальная чувствительность реакции, обеспечиваемая выявлением даже единичных клеток возбудителей, позволяет исполь-

зовать ПЦР в тех случаях, когда другие методы диагностики не дают положительного результата. Кроме того, длительность даже простого ПЦР-анализа с электрофоретической детекцией от этапа выделения ДНК обычно не превышает 1,5-2,0 часов [6].

Поэтому в данной работе нами был проведен ПЦР-скрининг распространенности и сочетанной встречаемости генов секретируемых ингибиторов лизоцима типа С, гемолизина, аэробактина, колибактина и энтеротоксина у условно-патогенных видов энтеробактерий.

### **Материалы и методы**

В работе использована разработанная ранее тест-система мониторинга патогенного потенциала энтеробактерий методом полимеразной цепной реакции (Патент РФ №2662930) с применением в качестве положительных контролей двух штаммов *Escherichia coli* и одного ранее секвенированного штамма *Klebsiella pneumoniae* (табл.). В качестве отрицательного контроля использованы штаммы *Micrococcus luteus* М1 и *Salmonella enterica* ATCC 14028.

*Таблица.* Состав тест-системы для ПЦР-скрининга патогенного потенциала энтеробактерий

Детерминанта	Ген	Длина специфичных ампликонов, н.п.	Положительный контроль
Энтеротоксин С	<i>espC<sub>c</sub></i>	177	<i>E. coli</i> ICIS-235 (K0)
	<i>espC<sub>p</sub></i>	192	
Система гемолизина	<i>hlyA</i>	185	<i>E. coli</i> ICIS-236 (K1)
	<i>hlyC</i>	191	
Ингибитор лизоцима С	<i>ivyC</i>	190	<i>K. pneumoniae</i> ICIS-278 (K2)
	<i>pliC<sub>p</sub></i>	151	
Система аэробактина	<i>iucB</i>	115	
	<i>iucC</i>	143	
Система колибактина	<i>clbB</i>	201	
	<i>clbN</i>	162	

Объектом исследования послужили 160 штаммов условно-патогенных энтеробактерий, относящихся к видам *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* из коллекции штаммов лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований ИКВС ОФИЦ УрО РАН, выделенных из следу-

ющих источников:

- 1) условно-здоровые люди (53 штамма *E. coli*);
- 2) пациенты с заболеванием желудочно-кишечного тракта (20 штаммов *E. coli*);
- 3) пациенты с реактивным артритом (13 штаммов *E. coli*);
- 4) пациенты с острой кишечной инфекцией (70 штаммов: 34 – *K. pneumoniae*, 36 – *E. coli*);
- 5) пациенты с инфекциями мочевыводящих путей (30 штаммов *E. coli*).

Выделение матричной ДНК каждого исследуемого штамма для ПЦР проводилось с использованием 0,1 мл смеси реагентов «ДНК-Экспресс» (НПФ «Литех», Россия) в программируемом твердотельном термостате «Терцик МС-2» (ООО «ДНК-технология», Россия) в течение 20 мин. при температуре 98°C с последующим центрифугированием при 16100 g в течение 1/2 мин. Полученный супернатант вносился в подготовленную реакционную смесь для ПЦР в объеме 5 мкл.

Реакционная смесь для ПЦР в объеме 15 мкл приготавливалась из набора праймеров и реагентов ООО «Синтол» в составе: 2 мкл 25 мМ раствора магния хлорида, 2 мкл 10-кратного ПЦР-буфера Б, 1,6 мкл 2,5 мМ раствора дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 0,5 мкл 10 мкМ смеси каждой пары праймеров, 0,2 мкл 5 ед/мкл раствора Таq-полимеразы и 8,2 мкл деионизованной воды. Реакция проводилась в ДНК-амплификаторе «Терцик МС-2» в течение 30 циклов [6]. Температура фазы отжига была фиксированной для всех исследуемых праймерных пар: 62°C, температура фазы элонгации: 72°C, длительность фаз отжига и элонгации: 4 и 6 с соответственно [7].

Получаемые ампликоны подвергались агарозному гель-электрофорезу. С этой целью 18 мкл раствора, содержащего амплифицированную ДНК, смешивали с 5 мкл 10-кратного буфера для внесения с бромфеноловым синим, и вносили в лунки 2,5-3,0% агарозного геля. Электрофорез проводился в ТВЕ-буфере однократной концентрации с 50 мкг/мл этидия бромида в качестве люминесцентного красителя при напряженности поля 11 в/см в течение 20 мин [8]. Визуализация результатов разделения нуклеиновых кислот проводилась на установке гель-документирования «Vilber Lourmat» (Франция) с использованием маркера молекулярных масс «100 bp».

### **Результаты и обсуждение**

В начале работы, перед осуществлением скрининга опытных проб, бы-

ло проведено комбинирование праймерных пар в одной пробе в пределах детерминант с учётом длины получаемых ампликонов для различения полос их люминесценции на фореграмме (разница длин ампликонов – не менее 10 нуклеотидных пар), в результате чего удалось в 2-3 раза оптимизировать исходный вариант тест-системы при помощи множественной полимеразной цепной реакции (рис. 1).

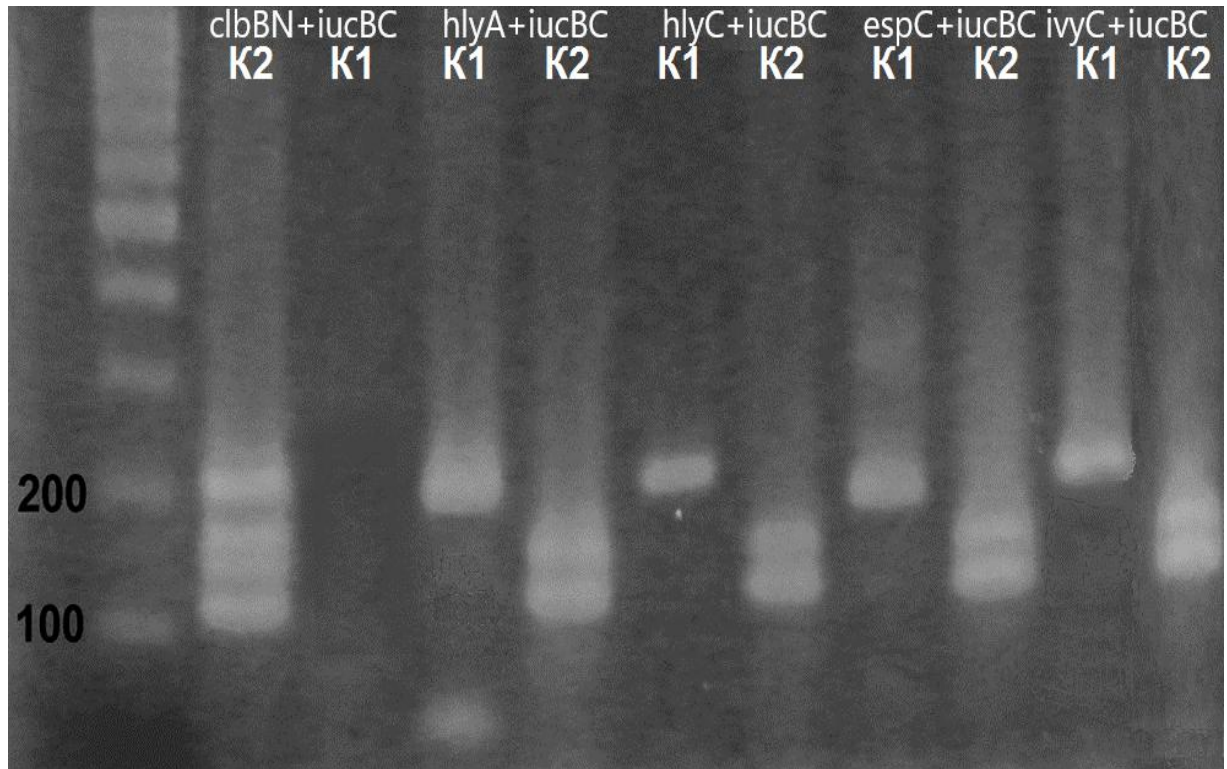


Рис. 1. Фореграмма результатов множественного ПЦР-анализа исследуемых генетических детерминант.

*Примечание:* в крайней левой дорожке – маркер молекулярных масс «100 bp»; обозначения соответствуют данным в табл. 1.

Проведенный ПЦР-скрининг ДНК исследуемых штаммов энтеробактерий показал, что у пациентов с хроническими заболеваниями (заболевания ЖКТ и реактивный артрит) встречаемость детерминант аэробактина не показала достоверных отличий от контроля, тогда как встречаемость колибактина оказалась выше, чем у штаммов, выделенных от условно-здоровых лиц (рис. 2).

Также были подтверждены данные о более высокой встречаемости детерминант аэробактина у уроштаммов исследуемых видов энтеробактерий – свыше  $\frac{1}{2}$  случаев по сравнению с копроштаммами, у которых распространенность данных детерминант составила всего от  $\frac{1}{3}$  до  $\frac{1}{2}$  штаммов исследуемой выборки.

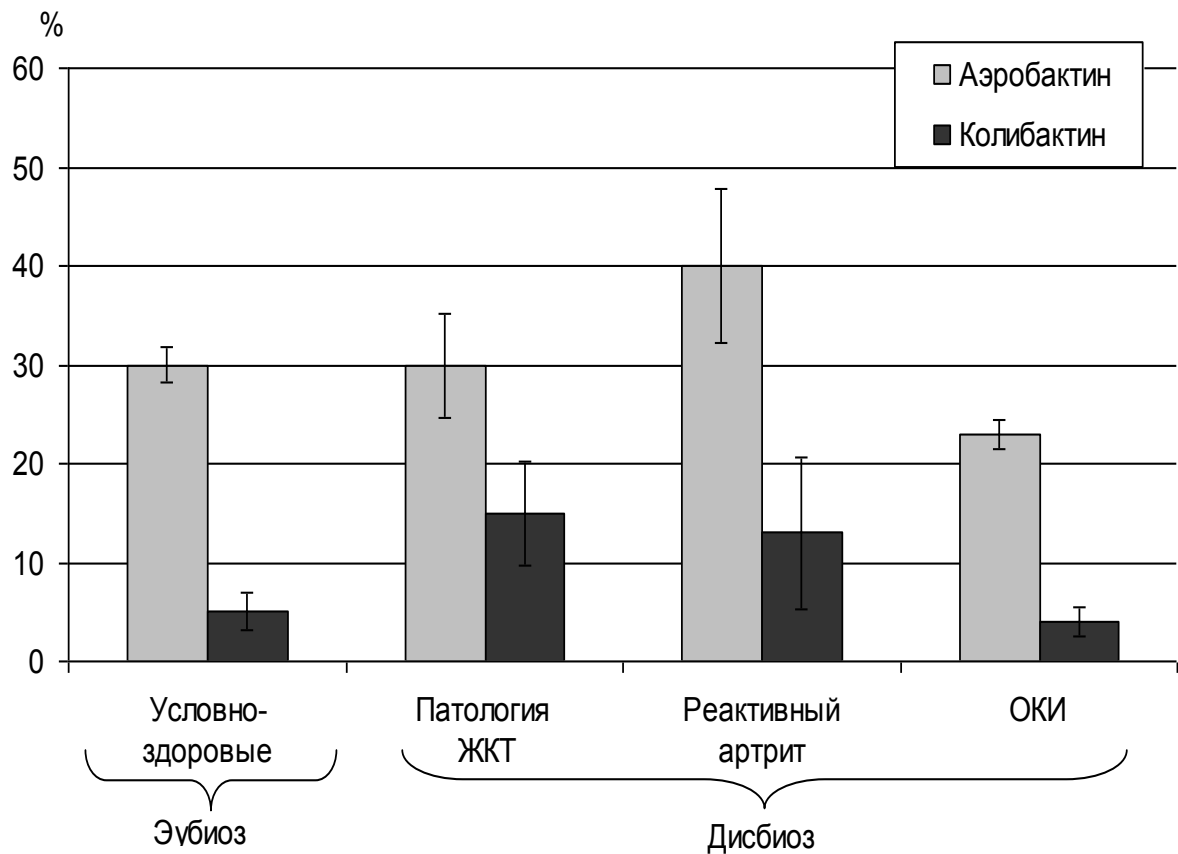


Рис. 2. Распространенность генетических детерминант сидерофоров, способствующих персистенции энтеробактерий.

Кроме того, было установлено, что выделенные из ЖКТ условно-патогенные кишечные палочки с гемолитической активностью в 3/4 случаев являлись носителями генов колибактина, а все выявленные клебсиеллы-носители плазмидного гомолога гена секретируемого ингибитора лизоцима С также являются носителями детерминант обеих исследуемых систем сидерофоров: аэробактина и колибактина.

### **Заключение**

Таким образом, результаты проведенного скрининга, с одной стороны, подтверждают ранее установленные данные о распространенности аэробактина у условно-патогенных энтеробактерий, а с другой – показывают значимость системы колибактина не только как важного компонента системы прямого межмикробного антагонизма с генотоксической активностью в отношении эукариотических клеток, но и как возможного синергиста гемолизина и фактора персистенции во внутренней среде хозяина – подобно аэробактину.

*(Работа выполнена при грантовой поддержке РФФИ по конкурсу «Мой первый грант», проект № 18-34-00853 мол\_а» и поддержана стипендией Правительства Оренбургской области для молодых кандидатов наук)*



**ЛИТЕРАТУРА**

1. Андриющенко С.В., Перунова Н.Б., Бухарин О.В. Гомологи гена периплазматического ингибитора лизоцима PliC и их роль в антилизоцимной активности энтеробактерий. Микробиология. 2013. 3: 302-311.
2. Bielaszewska M., Aldick T., Bauwens A., Karch H. Hemolysin of enterohemorrhagic Escherichia coli: structure, transport, biological activity and putative role in virulence. Int. J. Med. Microbiol. 2014. 304 (5-6): 521-529.
3. Searle L.J., Méric G., Porcelli I., Sheppard S.K., Lucchini S. Variation in siderophore biosynthetic gene distribution and production across environmental and faecal populations of Escherichia coli. PLoS One. 2015. 10 (3): e0117906.
4. Johnson J.R., Johnston B., Kuskowski M.A., Nougayrede J.P., Oswald E. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the Escherichia coli pks genomic island. J. Clin. Microbiol. 2008. 46 (12): 3906-3911.
5. Mellies J.L., Navarro-Garcia F., Okeke I., Frederickson J., Nataro J.P., Kaper J.B. espC pathogenicity island of enteropathogenic Escherichia coli encodes an enterotoxin. Infect. Immun. 2001. 69 (1): 315-324.
6. Carman W.F., Kidd A.H. An assessment of optimal conditions for amplification of HIV cDNA using Thermus aquaticus polymerase. J. Virol. Methods. 1989. 23 (3): 277-289.
7. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР “в реальном времени”. М.: БИНОМ, 2009. 223 с.
8. Маниатис Т. Фрич Э. Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир., 1984. 480 с.

*Поступила 12 сентября 2019 г.*

*(Контактная информация: Андриющенко Сергей Валерьевич - к.м.н., с.н.с. лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел. 8 (919) 846 5661; e-mail: [rurattus000@gmail.com](mailto:rurattus000@gmail.com);*

*Здвижкова Ирина Александровна - к.м.н., н.с. лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел. 8 (987) 786 1849)*

---

---

**LITERATURE**

1. Andryushenko S.V., Perunova N.B., Bukharin O.V. Periplasmic lysozyme inhibitor PliC and its role in antilysozyme activity of enterobacteria. Microbiology. 2013. 3: 302-311.
2. Bielaszewska M., Aldick T., Bauwens A., Karch H. Hemolysin of enterohemorrhagic Escherichia coli: structure, transport, biological activity and putative role in virulence. Int. J. Med. Microbiol. 2014. V. 304, N. 5-6. P.: 521-529.
3. Searle L.J., Méric G., Porcelli I., Sheppard S.K., Lucchini S. Variation in siderophore biosynthetic gene distribution and production across environmental and faecal populations of Escherichia coli. PLoS One. 2015. V. 10, N. 3. e0117906.
4. Johnson J.R., Johnston B., Kuskowski M.A., Nougayrede J.P., Oswald E. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the Escherichia coli pks genomic island. J. Clin. Microbiol., 2008, V. 46, N. 12. P: 3906-3911.
5. Mellies J.L., Navarro-Garcia F., Okeke I., Frederickson J., Nataro J.P., Kaper J.B. espC pathogenicity island of enteropathogenic Escherichia coli encodes an enterotoxin. Infect. Immun., 2001, V. 69, N.1, P: 315-324.
6. Carman W.F., Kidd A.H. An assessment of optimal conditions for amplification of HIV cDNA using Thermus aquaticus polymerase. J. Virol. Methods. 1989, V. 23, N.3, P. 277-289.
7. Rebrikov D.V., Trofimov D.Yu. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis.



Applied biochemistry and microbiology, 2006, V. 42, N.5, P. 455-463.

8. Maniatis T., Fritsch E.F., and Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982, 545p.

**Образец ссылки на статью:**

Здвижкова И.А., Андрющенко С.В. ПЦР-мониторинг персистентного потенциала энтеробактерий. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2019. 3. 7с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2019-3/Articles/ZIA-2019-3.pdf>).

**DOI: 10.24411/2304-9081-2019-13029**